免疫檢測試紙條在蘭花病毒快篩檢測之應用

農試所植病組 陳金枝 江芬蘭 黃美容 鄭淮嶸

一、前言

植物病毒檢測對健康種苗的重要性

作物栽培過程中，受病毒感染者或有出現葉片嵌紋、斑駁或畸型化，植株黃化或矮化皺縮等不正常生長的癥狀；但也常有不顯現徵狀者的潛伏期現象，然而帶有病毒之植株或種球(苗)乃病毒傳播於無形的風險因子。病毒是由核酸及蛋白外鞘組成的分子體，需藉由寄主作物之代謝系統才能複製維生，植物病毒無法如真菌或細菌等病原菌以人工培養基進行型態之診斷鑑定，加上無病癥顯現者，唯有以檢驗檢測方式加以追蹤，掌握病毒在植物體內存在之狀況，以能在”健康種苗”的防治策略上確保源頭母本的健康度。

常用之植物病毒檢測法

檢測病毒，主要針對其分子體的兩種基本組合成份-核酸及蛋白。針對蛋白質成份的檢測以免疫血清檢測法為主，利用”抗原-抗體”專一性原理，以病毒之蛋白質為抗原所製備出之抗體，用以捕捉相對應的病毒顆粒進行該病毒之檢測。常用的免疫檢測法如酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、直接組織轉漬法 (Direct tissue blotting, DTB；或稱 Direct tissue blot immunoassay, DTBIA；Tissue-blot immunoassay, TBIA)、西方墨點法 (Western blotting)和免疫檢測試紙條 (Immunostrip test)等。其中ELISA可應用於大量樣品的篩檢，並且由於其準確度高及成本較低，最終結果可數值量化用以評估反應結果，已廣被國際間利用於病原之檢測。

針對病毒核酸分子的檢測，常用者為聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)或是針對RNA分子的反轉-聚合酶鏈鎖反應(Reverse transcription-PCR, RT-PCR)、核酸探針雜合分析法(DNA probe hybridization)和生物晶片檢測法(Biochip assay)。

PCR或是RT-PCR法，由於其高敏感度及可快速檢測的效率，已普遍被使用於植物病毒核酸的檢測；其檢測敏感度

作　　者：陳金枝助理研究員
連絡電話：04-23317518

較免疫血清法高，但成本也較高，但應用於健康種苗之母本健康監測，可更加確保母本的健康品質。此外，在無抗血清可用於未知病毒之檢測鑑定前，可利用核酸檢測法所設計之特定病毒引子對直接針對病毒核酸進行檢測，達到對特定病毒檢測的效果。

二、免疫檢測試紙條在檢測植物病毒之研發現況

免疫檢測試紙條之特色

免疫檢測試紙條 (Immunostrip test) 或稱側流層析分析法 (lateral flowassay) 及溶膠顆粒免疫測定法(solparticle immunoassay)，乃應用膠體金免疫層析法 (colloidalgol dimmunochromatographic assay) 原理製成之檢測試劑。檢測時不需要實驗室及儀器設備，具有簡易方便而時間短之即時檢測特性，適用於港口邊境檢疫及田間病害現場診斷。近年來已有許多種植物病毒之免疫快篩試紙檢測法被開發出來之報告或已商品化之試劑 (表一)，如百合之*Lily symptomless virus* (LSV)、*Lily mottle virus* (LMoV)和*Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV)；百香果之*Telosma mosaic virus* (TeMV)；蘭花之*Cymbidium mosaic virus* (CyMMV)、*Odontoglossum ringspot virus* (ORSV)和*Cucumber mosaic virus* (CMV)；其他如*Carnation mottle virus* (CarMV)、*Bean mild mosaic virus* (BMMV)、*Tobacco mosaic virus* (TMV)、*Potato virus* X (PVX)、*Potato virus* Y (PVY)、*Sugarcane mosaic virus* (SCMV)、*Pepino mosaic virus* (PepMV)和*Citrus tristeza virus* (CTV)等。

影響免疫檢測試紙條製備之條件

植物病毒免疫檢測試紙製備過程包括 (1) 受測病毒抗體之製備及抗體免疫球蛋白純化、(2)抗體與膠體金(colloidal gold) 配對、以及(3)抗體畫線於檢測試紙條上和組裝；每個過程均是影響檢測試紙條製作成功的關鍵，尤其也會受不同批號病毒抗血清的品質、病毒抗體濃度以及與膠體金結合的酸鹼值等，均為免疫試紙條製備之影響因子。

三、蘭花病毒CymMV和ORSV免疫檢測試條開發應用現況

蘭花病毒病及其對產業之影響

病毒病為影響蘭花生育品質的關鍵病害之一，對蘭花產業的影響包括(1)直接影響蘭花品質，於繁殖及栽培過程中受病毒病的感染，若引起植株明顯病毒病徵狀者 (如葉綠素分佈不均的嵌紋病徵、黃斑或壞疽斑、花朵色澤不均或畸形等)，則會損及蘭花之商品價值；(2)蘭花輸出之病毒檢疫要求，影響蘭花輸出之產值與競爭力；(3)無特定病毒母本直接影響其量化繁殖種苗之品質。

經過病毒檢測程序，確保無特定病毒蝴蝶蘭健康種苗的生產，已成為現今國際蘭花產業界之共識，更是維持台灣蝴蝶蘭國際品質競爭力的重要優勢。因此，在不同繁殖或栽培過程中，配合定期病毒健診以維護種苗之健康品質甚為重要。國際間已記錄可感染蘭花之病毒種類高達50種以上，台灣已發生有紀錄之蘭花病毒大約6種，包括蕙蘭嵌紋病毒

(*Cymbidium mosaic virus*, CymMV)、齒舌蘭輪斑病毒*Odontoglossum ringspot virus* ORSV)、胡瓜嵌紋病毒*Cucumber mosaic virus* (CMV)、番椒黃化病毒 *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)、蝴蝶蘭黃斑病毒 *Phalaenopsis chlorosis spot virus* PhCSV和康乃馨斑紋病毒 *Carnation mottle virus* (CarMoV)。其中以CymMV和ORSV為蘭花普遍發生之兩種病毒，並為國際間特別關注的兩種重要蘭花病毒。CymMV或ORSV常引起葉片黃綠不均之嵌紋病徵，病徵明顯程度則因蘭花品系而異，紀錄上受此兩種病毒複合感染時，病徵會更

表一、免疫檢測試紙條在植物病毒檢測之研發應用現況

病毒種類	寄主	參考文獻	備註
Cymbidium mosaic virus (CyMMV)	蘭科花卉 (*Orchidaceae*)	陳金枝等。2010。植保會刊 52: 17-24。	已商品化
Odontoglossum ringspot virus (ORSV)	蘭科花卉 (*Orchidaceae*)	陳金枝等。2010。植保會刊 52: 17-24。	已商品化
Lily symptomless virus (LSV)	百合 (*Lilium* spp.)	Zhang, Y. *et al*. 2015. J. Virol. Methods 220: 13-17.	
Lily mottle virus (LMoV)	百合 (*Lilium* spp.)	Zhang, Y. *et al*. 2015. J. Virol. Methods 220: 43-48.	已商品化
Plantago asiatica mosaic virus (PlAMV)	百合 (*Lilium* spp.)	陳金枝等。2013。台灣農業研究 62 (3): 268-279。	已商品化
Telosma mosaic virus (TeMV)	夜香花 (*Telosma* sp.)	Chiemsombat, P. *et al*. 2014. Crop Protect. 63: 41-47.	
Carnation mottle virus (CarMV)	康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*)	Byzova, *et al*. 2009. Appl. Biochem. Microbiol. 45:204-209.	
Bean mild mosaic virus (BMMV)	四季豆 (*Phaseulus Vulgaris* L.)	Byzova, *et al*. 2009. Appl. Biochem. Microbiol. 45:204-209.	
Tobacco mosaic virus (TMV)	菸草 (*Nicotiana* spp.)	Yoon, *et al*. 2014. J. Korean Soc. Inter. Agricul. 26(1): 62-67.	
Potato virus X (PVX)	馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)	Drygin, *et al*. 2012. Appl. Micro. Biotech. 93(1): 179-189.	已商品化 Agdia
Potato virus Y (PVY)	馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)	Byzova, *et al*. 2009. Appl. Biochem. Microbiol. 45:204-209.	已商品化 Agdia
Sugarcane mosaic virus (SCMV)	甘蔗 (*Saccharum* sp.)	Bandla, *et al*. 2009. U.S. Patent No 7,585,641.	
Pepino mosaic virus (PepMV)	香瓜 (*Cucumis* sp.)	Salomone & Roggero. 2002. J. Plant Pathol. 84: 65-68.	已商品化 Agdia
Citrus tristeza virus (CTV)	柑橘 (*Citrus* sp.)	Salomone, *et al*. 2004. J. Plant Pathol.: 43-48.	已商品化 Agdia
Cucumber mosaic virus. (CMV)	黃瓜 (*Cucumis sativus*) 番茄 (*Solanum lycopersicum*) 胡椒 (*Piper nigrum*)	Yoon, *et al*. 2014. J. Korean Soc. Inter. Agricul. 26(1): 62-67.	已商品化 Agdia

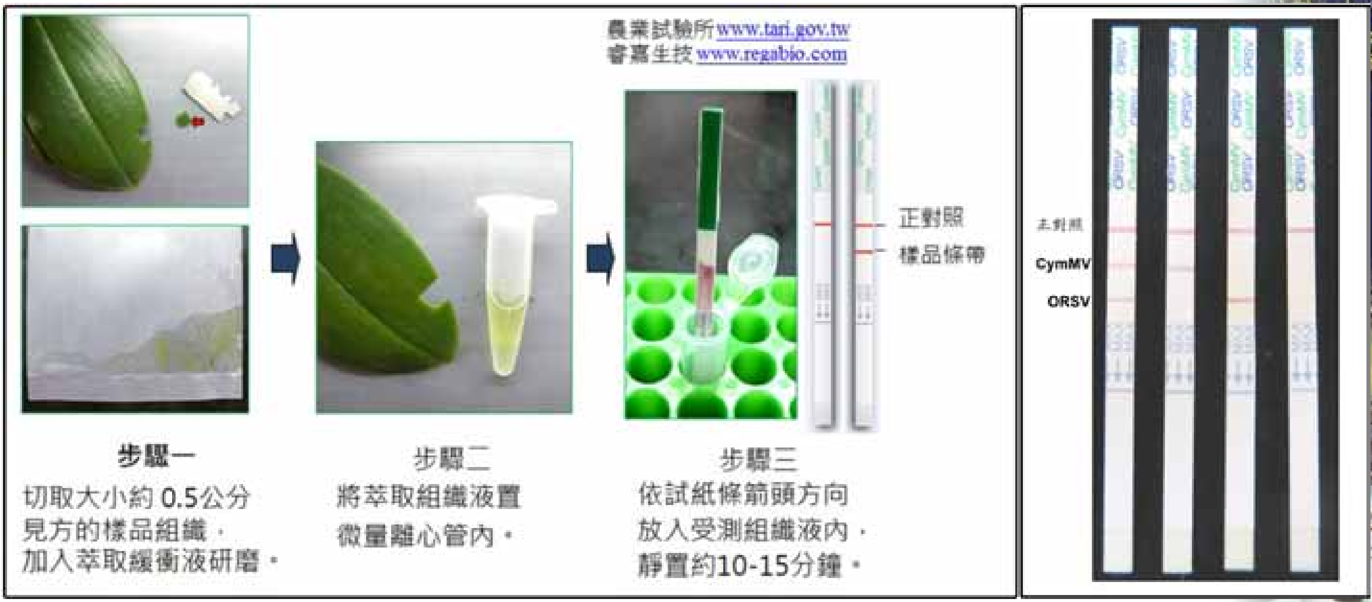
為嚴重；然而，現今蘭花品系繁多，有些品系即使受病毒感染也常見無病徵表現者，若僅以目視法觀察病徵則容易誤判。

蘭花病毒CymMV和ORSV抗體技術授權予生技公司開發加值型檢測試劑—免疫快篩檢測試紙條

農業試驗所已開發有至少9種蘭花病毒之免疫檢測用抗體，目前已實務應用於無特定病毒蘭花健康種苗繁殖之檢測及出口檢疫的病毒檢測服務；2010年進一步與生技公司進行專業合作，將CymMV和ORSV之抗體及抗原技術授權予睿嘉生物科技股份有限公司 (REGA BIOTECHNOLOGY INC. https://www.regabio.com) 研製免疫快篩檢測試紙條 (表一)，授權公司已開發成可於同一試紙條上一次檢測CymMV和ORSV免疫快篩檢測試紙條之試劑套組，並已商品化銷售(Agitest™ , Rega)。利用快篩試紙條檢測時，僅需取樣少量組織 (約0.5公分見方) 置於試劑套組內專用之緩衝液混合並研磨後，再將免疫試紙條一端放入組織液中，靜置15分鐘內便能透過免疫反應線條之目視觀察進行判讀 (圖一)。利用免疫檢測試紙條可跳脫專業，不需儀器、不限時地，隨手攜帶，輕鬆操作地完成現場即時檢測。

國內自製已商品化之CymMV和ORSV二合一免疫檢測試紙條，檢測效率優於ELISA

本研究測試以商品化之CymMV/ORSV二合一免疫檢測試紙條對蝴蝶蘭和石斛蘭上之病毒檢測效果，與常用的ELISA法比較下 (表二)，免疫檢測試紙條檢出CymMV和ORSV的比例分別為7/20和7/20，均高於以ELISA法檢出之5/20和0/20；顯示此國內生技公司自製並已商品化流通之CymMV/ORSV免疫檢測試紙條對此兩種病毒之檢出效果優於ELISA法。



圖一、免疫試紙條檢測兩種蘭花病毒之步驟(左)及其反應結果判讀(右)。

此種免疫檢測試紙條技術，在具有優於ELISA法的病毒檢出效果前提下，適用於無實驗室或ELISA儀器設備與檢測技術之蘭園進行病毒自主監測管理之用，對於蘭花產業發展之競爭力與穩定具有關鍵性之效益；加上免疫檢測試紙條攜帶方便，可隨時隨地進行現場即時檢測。

表二、以ELISA法及免疫試紙條法檢測兩種蘭花病毒之比較

病毒名稱	CymMV		ORSV	
樣品	ELISA	試紙條	ELISA	試紙條
石斛蘭 1	0.07	-	0.03	-
石斛蘭 2	0.07	-	0.04	+
石斛蘭 3	0.08	+	0.03	+
石斛蘭 4	0.07	-	0.03	+
石斛蘭 5	3.03	+	0.03	-
石斛蘭 6	0.08	-	0.02	-
石斛蘭 7	0.08	-	0.09	-
石斛蘭 8	0.07	-	0.06	-
石斛蘭 9	0.06	-	0.03	-
石斛蘭 10	0.43	+	0.05	-
蝴蝶蘭 1	0.06	-	0.03	-
蝴蝶蘭 2	0.08	-	0.06	-
蝴蝶蘭 3	2.13	+	0.04	-
蝴蝶蘭 4	0.08	-	0.03	-
蝴蝶蘭 5	0.07	-	0.02	-
蝴蝶蘭 6	0.08	+	0.02	+
蝴蝶蘭 7	3.38	+	0.03	+
蝴蝶蘭 8	0.07	-	0.02	-
蝴蝶蘭 9	1.15	+	0.02	+
蝴蝶蘭 10	0.09	-	0.06	-
病組織對照	2.58	+	1.84	+
健康對照	0.20	-	0.17	-
檢出比例	5/20	7/20	0/20	7/20

檢出病毒 (+)；未檢出病毒 (-)。

四、結語

免疫快篩試紙條檢測法可提供快速檢測作物病毒之效果，15分鐘內結果立現，判讀容易且不須儀器設備與實驗室空間，為極適合大眾化的簡易檢測法。蘭花產業為我國極具國際競爭力之花卉產業，包括蝴蝶蘭、文心蘭、小花蕙蘭等，從母本保存及育種、組織培養繁殖量化、馴化苗及蘭苗栽培、盆栽管理到包裝運輸行銷等，均已有專業分工之產業鏈在運作。蘭花或其種苗生產者在無實驗室及設備的環境下，可應用此法作自主品質把關。以目前國內生技公司自製已商品化之兩種蘭花病毒CymMV和ORSV的免疫檢測試紙條，除本研究之蝴蝶蘭和石斛蘭外，另用於測試不同蘭花材料均顯示可適用於文心蘭、嘉德利亞蘭和國蘭等之CymMV或ORSV病毒的檢測，更可擴大病毒免疫快篩試紙條所檢測的蘭花種類。